

대한민국 특허청

KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 10-2002-0038563
Application Number PATENT-2002-0038563

출원년월일 : 2002년 07월 04일
Date of Application JUL 04, 2002

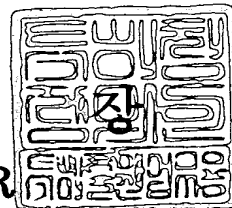
출원인 : 아미코젠주식회사
Applicant(s) AMICOGEN CO., LTD.



2002 년 12 월 17 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.07.04
【발명의 명칭】	트랜스포존을 이용한 무작위 코돈 돌연변이 기법
【발명의 영문명칭】	TRANSPOSON-MEDIATED RANDOM CODON-BASED MUTAGENESIS
【출원인】	
【명칭】	아미코젠주식회사
【출원인코드】	1-2000-028103-1
【대리인】	
【성명】	이현실
【대리인코드】	9-1999-000366-5
【포괄위임등록번호】	2001-034538-6
【대리인】	
【성명】	장성구
【대리인코드】	9-1998-000514-8
【포괄위임등록번호】	2001-034533-0
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이시형
【성명의 영문표기】	LEE, Si Hyung
【주민등록번호】	670211-1565717
【우편번호】	660-769
【주소】	경상남도 진주시 신안동 신안3차 주공아파트 314-906
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	왕은선
【성명의 영문표기】	WANG, Eun Sun
【주민등록번호】	770121-2830615
【우편번호】	667-812
【주소】	경상남도 하동군 악양면 신성리 887-3
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김은정
 【성명의 영문표기】 KIM, Eun Jung
 【주민등록번호】 710507-2928228
 【우편번호】 664-942
 【주소】 경상남도 사천시 사남면 월성리 12-1번지 한주빌라트 105-503
 【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 전영중
 【성명의 영문표기】 JEON, John Yj
 【주민등록번호】 560326-1794411
 【우편번호】 134-070
 【주소】 서울특별시 강동구 명일동 54번지 한양아파트 1-907
 【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 신용철
 【성명의 영문표기】 SHIN, Yong Chul
 【주민등록번호】 600804-1927212
 【우편번호】 660-290
 【주소】 경상남도 진주시 주악동 360번지 현대아파트 118-302
 【국적】 KR

【심사청구】 청구

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 9
 【서열목록의 전자파일】 첨부

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
 이현실 (인) 대리인
 장성구 (인)

【수수료】

【기본출원료】	20	면	29,000	원
【가산출원료】	30	면	30,000	원
【우선권주장료】	0	건	0	원

1020020038563

출력 일자: 2002/12/18

【심사청구료】	16	항	621,000	원
【합계】	680,000		원	
【감면사유】	소기업 (70%감면)			
【감면후 수수료】	204,000		원	
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통			

【요약서】**【요약】**

본 발명은 단백질의 방향적 진화(directed evolution)를 위한 무작위 코돈 돌연변이 방법(random codon-based mutagenesis)에 관한 것으로, 구체적으로 트랜스포존(transposone)을 이용하여 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 무작위 위치의 연속한 염기서열을 특정 혹은 무작위 코돈으로 치환시키거나, 특정 혹은 무작위 코돈을 목적 DNA의 무작위 위치에 삽입시키거나, 또는 목적 DNA 상에서 무작위 위치의 연속한 염기서열을 삭제시켜 DNA 상에 돌연변이를 유발시키고 이들이 발현하는 단백질의 스크리닝을 통해 원하는 방향으로 성질이 개선된 유용 돌연변이 단백질 및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 얻는 방법에 관한 것이다.

【대표도】

도 1

【명세서】

【발명의 명칭】

트랜스포존을 이용한 무작위 코돈 돌연변이 기법{TRANSPOSON-MEDIATED RANDOM CODON-BASED MUTAGENESIS}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명의 무작위 코돈 돌연변이 방법을 이용하여 치환 돌연변이 라이브러리를 제조하는 한 예를 나타낸 것으로, 목적 DNA의 무작위 위치에서 3개의 뉴클레오티드를 ATG 또는 CAT로 치환하는 것을 한 예로 도시하였다. 트랜스포존으로는 Tn7을 이용하였고 제 1, 2의 카세트 내에 존재하는 클래스 II S 제한효소 절단 부위는 *Bsg* I의 절단 부위를 나타냈다. 카세트 DNA의 염기서열들은 이탤릭체로 표기하였다. 1 단계 과정 중 밀줄친 염기서열 부위는 트랜스포존이 목적 DNA에 삽입될 때 중복 복제된 목적 DNA의 일부 뉴클레오티드 서열 부위를 표시한 것이다.

↑ ↓ : 제한효소에 의한 절단부위

Kan^r: 카나마이신 저항성 유전자

도 2는 본 발명의 무작위 코돈 돌연변이 방법을 이용하여 삽입 돌연변이 라이브러리를 제조하는 한 예를 나타낸 것으로, 목적 DNA의 무작위 위치에서 3개의 무작위성 뉴클레오티드를 삽입하는 것을 한 예로 도시하였다. 트랜스포존으로는 Tn7을 이용하였으며 제 1, 2의 카세트 내에 존재하는 클래스 II S 제한효소 절단부위는 *Bsg* I 절단부위를 나타냈다. 카세트 DNA의 염기서열들은 이탤릭체로 표기하였다. 1 단계 과정 중 밀줄

친 염기서열 부위는 트랜스포존이 목적 DNA에 삽입될 때 중복 복제된 목적 DNA의 일부 뉴클레오티드 서열 부위를 표시한 것이다.

N: A, G, T, C 4종 염기의 혼합물

↑ ↓: 제한효소에 의한 절단부위

Kan^r: 카나마이신 저항성 유전자

도 3은 본 발명의 무작위 코돈 돌연변이 방법을 이용하여 삭제 돌연변이 라이브러리를 제조하는 한 예를 나타낸 것으로, 목적 DNA의 무작위 위치에서 3개의 뉴클레오티드를 삭제하는 것을 한 예로 도시하였다. 트랜스포존으로는 Tn7을 이용하였으며 제 1 카세트 내에 존재하는 클래스 IIS 제한효소 절단부위는 *Bsg* I 절단부위를 나타냈다. 카세트 DNA의 염기서열들은 이탤릭체로 표기하였다. 1 단계 과정 중 밀줄친 염기서열 부위는 트랜스포존이 목적 DNA에 삽입될 때 중복 복제된 목적 DNA의 일부 뉴클레오티드 서열 부위를 표시한 것이다.

↑ ↓: 제한효소에 의한 절단부위

Kan^r: 카나마이신 저항성 유전자

도 4는 본 발명의 무작위 코돈 돌연변이 방법에 이용될 수 있는 클래스 IIS 제한효소들의 인식부위 염기서열 및 절단부위를 나타낸 것이다.

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

<12> 본 발명은 단백질의 방향적 진화 (directed evolution)를 위한 무작위 코돈 돌연변이 방법 (random codon-based mutagenesis)에 관한 것으로, 구체적으로 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 무작위 위치의 연속한 염기서열을 특정 혹은 무작위 코돈으로 치환시키거나, 특정 혹은 무작위 코돈을 목적 DNA의 무작위 위치에 삽입시키거나, 또는 목적 DNA 상에서 무작위 위치의 연속한 염기서열을 삭제시켜 DNA 상에 돌연변이를 유발시키고 이들이 발현하는 단백질의 스크리닝을 통해 원하는 방향으로 성질이 개선된 유용 돌연변이 단백질 및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 얻는 방법에 관한 것이다.

<13> 생체 내의 유전정보는 궁극적으로 단백질을 생성함으로써 그 대부분의 기능을 수행하게 된다. 즉, 단백질은 생물체를 구성하는 세포나 조직 내에서 아주 정교한 특이성을 가지고 모든 생화학 반응을 일으키고 조절하며, 세포나 조직을 구성하는 성분역할을 하고 있다. 이러한 생체 고분자 화합물인 단백질은 20종류의 아미노산으로 구성된 중합물로서 단백질의 1차 및 2차 구조와 더불어 공간상의 입체 형태를 이루는 3차 및 4차 구조가 독특한 기능을 결정한다. 유전자 염기서열에 의해 암호화되는 1차 구조인 아미노산 서열은 단백질의 구조와 기능에 대한 정보를 함유하고 있다. 따라서, 개개의 아미노산 서열상의 변이는 단백질의 구조와 기능을 포함한 여러 가지 정보를 변화시킬 수 있다 (Shao, Z. and Arnold, F. H., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6:513-518, 1996).

<14> 최근 유전공학 기술이 급속도로 발전하여 단백질을 암호화하는 어떤 유전자든지 클로닝할 수 있게 되었으며, 이로부터 단백질을 대량 생산할 수 있게 되었다. 또한, 유전자에 낮은 빈도로 일어나는 자연발생적 돌연변이와는 달리 인위적으로 높은 빈도로 돌연변이를 유발시켜 원하는 목적 단백질을 얻기 위한 많은 방법들이 고안되어 왔다.

<15> 최근에 방향적 진화 (directed evolution) 기술은 목적 단백질로부터 원하는 방향으로 성질이 개선된 변이 단백질을 얻기 위한 강력한 수단으로서 많이 이용되고 있다. 방향적 진화 기술은 목적 단백질을 암호화하는 목적 유전자의 돌연변이 라이브러리를 제조하고 이들이 발현하는 변이 단백질의 스크리닝을 통해 원하는 방향으로 성질이 개선된 유용 단백질을 만들어 내는 기술이다. 이는 자연계에서 오랜 기간동안 생물체가 변이와 선택이라는 과정을 거쳐 진화하는 과정을 모방함으로써 목적 단백질을 원하는 방향으로 단기간에 진화시키는 방법이다 (Kuchner, O. and Arnold F. H., *Trends Biotechnol.* 15:523-530, 1997; Sutherland, J. D., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4:263-269, 2000; Bornscheuer, U. T. and Pohl, M., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5:137-143, 2001).

<16> 방향적 진화에 이용되는 변이 폴리뉴클레오티드를 제조하는 기술로서 현재 많이 이용되고 있는 기술로는 부위-특이 돌연변이 기법 (site-directed mutagenesis)(Sambrook, J. and Russell, D. W., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y., 2001), 카세트 돌연변이 기법 (cassette mutagenesis) (Arkin, A. and Youvan, D. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7811-7815, 1992; Delagrave et al., *Protein Engineering* 6:327-331, 1993; Goldman, E. R. and Youvan, D. C., *Bio/Technology* 10:1557-1561, 1992), 포화 돌연변이 기법 (saturation mutagenesis) (USP No. 6,171,820 및 USP No. 6,238,884), 에러-유

발성 중합효소 연쇄반응 기법 (error-prone PCR) (Leung, D. W. et al., *Technique* 1:11-15, 1989; Caldwell, R. C. and Joyce, G. F., :28-33, 1992; Gramm, H. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580, 1992), 화학적 돌연변이 기법 (chemical mutagenesis) (Myers, R. M. et al., *Science* 229:242-247, 1985; Walton, C. et al., *Directed Mutagenesis: A practical approach* (ed. M. J. McPherson), 135-162, IRL Press, Oxford, United Kingdom, 1991) 등이 있다.

<17> 이들 기술 중에서 부위-특이적 돌연변이 기법과 포화 돌연변이 기법, 카세트 돌연변이 기법들은 주로 목적 단백질의 특정 부위의 변이를 유발시키기 위한 방법으로 이용되고 있고, 무작위 위치에서의 돌연변이를 유발시키기 위한 방법으로는 에러-유발성 중합효소 연쇄반응 기법과 화학적 돌연변이 기법이 주로 이용되고 있다.

<18> 부위-특이적 돌연변이 기법은 돌연변이 염기서열을 가지는 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 DNA 상의 특정 염기를 치환시켜 원하는 부위에 DNA 염기서열의 변형을 일으키는 기술이다. 이 방법은 목적 단백질의 변이시키고자 하는 특정 아미노산의 구조나 기능 등에 대한 정보를 미리 알고 있어야 한다는 점 때문에 제한적으로 이용되고 있다. 또한, 이 방법을 이용하여 폴리펩티드 상의 모든 아미노산 잔기를 다른 아미노산으로 치환시키기 위해서는 치환시키고자 하는 코돈 염기서열이 포함된 각각의 올리고뉴클레오타이드를 모두 합성해야 하므로 폴리펩티드 상의 각 아미노산 잔기를 따라가면서 체계적으로 모든 돌연변이를 일으키기에는 부적절하다.

<19> 특정 아미노산 잔기를 모든 가능한 아미노산으로 치환시키기 위해서 무작위 올리고뉴클레오타이드를 이용한 포화 돌연변이 기법이 이용되고 있다. 하지만, 이 방법 역시 폴

리펩티드 서열을 따라서 각 아미노산 잔기를 체계적으로 돌연변이 시키는데는 적합하지 않다. 만약, 500개의 아미노산 잔기로 이루어진 단백질의 모든 잔기가 다른 아미노산으로 치환된 돌연변이체를 얻고자 한다면 최소한 500개 이상의 돌연변이 유발 올리고뉴클레오티드가 필요하며, 또한 500개의 독립적인 돌연변이 유발 반응이 필요하게 되어 상당한 경제적 부담 및 노동력이 요구된다.

<20> 카세트 돌연변이 기법은 목적 DNA의 특정 부위를 염기서열이 변화된 합성 올리고뉴클레오티드로 이루어진 카세트로 교체하는 돌연변이 기법이다. 이 방법 역시 목적 DNA의 모든 부위를 체계적으로 돌연변이 시키는데는 긴 시간과 경제적 부담 및 노동력을 요구하기 때문에 적합하지 않은 방법이다.

<21> 현재 라이브러리 형태로 DNA 상에서 무작위 돌연변이를 만드는 방법으로는 에러-유발성 중합효소 연쇄반응이 많이 이용되고 있다. 이 방법은 중합효소 연쇄반응시 반응조건을 조절함으로써 중합효소의 중합반응 에러율 (error-rate)을 변화시켜 돌연변이 라이브러리를 만드는 것이다. 이 방법은 원하는 돌연변이 빈도를 얻기 위해서 에러율을 적절히 조절해야만 하는 단점이 있고, 무엇보다도 이 돌연변이 방법으로는 3개의 염기로 구성된 코돈중 대부분 하나의 염기만이 치환됨으로써 한 아미노산 잔기당 발생할 수 있는 돌연변이 아미노산의 갯수가 한정되는 단점이 있다.

<22> 화학적 돌연변이 기법은 NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)나 히드록실아민 (hydroxylamine) 등의 화합물을 목적 DNA에 처리하여 무작위 돌연변이를 유발시키는 방법으로서, 이 방법 역시 에러-유발성 중합효소 연쇄반응 기법과 마찬가지로 에러율을 조절해야 하는 단점과 각각의 아미노산 잔기에 대해서 나머지 19개의 모든 가능한 아미노산 잔기로 치환시킬 수 없다는 단점을 가지고 있다.

- <23> 상기의 돌연변이 기법의 단점들을 극복할 수 있는, 예컨대 전체 아미노산 잔기를 따라 체계적으로 돌연변이 라이브러리를 만들 수 있고, 단백질의 무작위 위치에서 아미노산 서열의 변형을 일으키는데 있어서 어려움을 조절해야 하는 번거로움이 없으며, 각각의 아미노산 잔기에 대해서 모든 가능한 아미노산 치환을 유발시킬 수 있을 뿐만 아니라, 간편하고 경제적인 돌연변이 라이브러리를 만들 수 있는 기술은 단백질의 방향적 진화에 매우 유용한 방법으로 이용될 수 있을 것이다.
- <24> 단백질의 돌연변이를 유발시킬 목적으로 트랜스포존을 이용하는 방법으로는 트랜스포존을 이용한 기존의 주사 돌연변이 기법(scanning mutagenesis)이 이용되고 있다 (Hallet, B. et al., *Nucleic Acids Res.* 25:1866-1867, 1997; Cao, Y. et al., *J. Mol. Biol.* 274:39-53, 1997; Hayes, F. et al., *J. Biol. Chem.* 272:28833-28836, 1997; Hayes, F. et al., *Cancer Res.* 60:2411-2418, 2000). 하지만 이 방법은 대부분의 돌연변이의 형태가 목적 단백질 내부에 5개의 아미노산이 삽입되는 형태로 나타나기 때문에 그 이용이 단백질의 성질을 개선하기 위한 방법으로는 매우 제한적일 수밖에 없다.
- <25> 이에 본 발명자들은 단백질의 방향적 진화에 매우 유용한 방법을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과 "트랜스포존을 이용한 무작위 코돈 돌연변이 방법"을 개발하여 본 발명을 완성하였다.
- <26> 본 발명은 목적 단백질 내에 여러 개의 아미노산을 (대부분의 경우 5개) 삽입시키는 형태의 주사 돌연변이와는 달리 목적 단백질 내에 아미노산의 삽입뿐만이 아니라 치환과 삭제를 모두 구현할 수 있어 단백질의 성질을 개선하기 위한 매우 유용한 돌연변이 기법을 제공한다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <27> 본 발명의 목적은 목적 단백질에 대한 무작위적인 아미노산 잔기의 치환, 삭제 및 삽입 돌연변이 라이브러리를 효율적으로 제조하여 원하는 방향으로 성질이 개선된 유용 돌연변이 단백질 및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 얻는 방법을 제공하는 것이다.
- <28> 본 발명의 다른 목적은 두 종류 이상의 변이 폴리뉴클레오타이드에서 확인된 각각의 변이 DNA 서열을 하나의 주형 목적 폴리뉴클레오타이드에 도입하여 복수의 변이 부위를 갖는 변이 폴리뉴클레오타이드를 제조하여 원하는 방향으로 성질이 개선된 유용 돌연변이 단백질 및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 얻는 방법을 제공하는 것이다.
- <29> 본 발명의 또 다른 목적은 얻어진 복수의 변이 부위를 갖는 폴리뉴클레오타이드를 목적 DNA로 하여, 돌연변이를 통해 폴리펩티드 및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 진화시키는 방법을 반복하는 단계를 포함하는 폴리펩티드 및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 진화시키는 방법을 제공한다.

【발명의 구성 및 작용】

- <30> 상기 목적에 따라, 본 발명은 목적 단백질에 대한 아미노산 잔기의 무작위적인 치환, 삽입 및 삭제 돌연변이 라이브러리를 효율적으로 제조할 수 있는 무작위 코돈 돌연변이 방법 (random codon-based mutagenesis)을 제공한다.
- <31> 먼저, 본 발명의 무작위 코돈 돌연변이 방법 중 코돈 치환 돌연변이를 통해 폴리펩티드 및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 진화시키는 방법은 도 1에 나타난 바와 같이, 다음과 같은 단계를 포함한다:

- <32> 1) 목적 DNA의 무작위 위치에 트랜스포존(transposon)을 삽입시킨 후, 트랜스포존의 양쪽 말단부위에 있는 제한효소부위를 절단하여 트랜스포존을 제거함으로써 무작위 위치에서 한번 절단된 구조의 목적 이중가닥 DNA들을 얻는 단계,
- <33> 2) 목적 DNA의 절단된 양쪽 말단 중 한쪽 말단 부위에 존재하는 트랜스포존 유래의 뉴클레오티드 서열과 트랜스포존 삽입 과정 중 중복 복제된(duplicated) 목적 DNA의 뉴클레오티드 서열을 제거하는 단계,
- <34> 3) 2) 단계에서 뉴클레오티드 서열이 제거된 말단 부위에 치환시키고자하는 코돈 뉴클레오티드를 삽입하고, 목적 DNA의 다른 쪽 말단에서 트랜스포존 유래의 뉴클레오티드 서열과 목적 DNA의 연속한 3 bp의 뉴클레오티드 서열을 제거하는 단계,
- <35> 4) 3) 단계에서 제조된 목적 DNA의 두 말단을 자가연결(self-ligation)시켜 무작위 위치에서 돌연변이된 라이브러리를 제조하는 단계, 및
- <36> 5) 4)의 라이브러리를 적당한 숙주세포에서 발현시킨 후 목적 단백질을 선별하거나 스크리닝하여 원하는 특성을 가진 변이 폴리펩티드 및 이를 암호화하는 변이 폴리뉴클레오티드를 얻는 단계.
- <37> 상기 방법에서 2) 단계는 절단된 부위에 제 1 카세트 DNA를 도입하는 단계, 및 제한효소에 의한 카세트 DNA의 절단 및 트랜스포존 삽입 과정 중 중복된 서열이 존재하는 쪽의 돌출 말단의 평활 말단화에 의하여 목적 DNA의 한쪽 말단 부위에 존재하는 트랜스포존 유래의 뉴클레오티드 서열과 트랜스포존 삽입 과정 중 중복 복제된(duplicated) 목적 DNA의 뉴클레오티드 서열을 제거하는 단계를 포함할 수 있다.

<38> 또한 상기 방법에서 3) 단계는 절단된 부위에 삽입시키고자하는 코돈 뉴클레오티드를 포함하는 제 2 카세트 DNA를 도입하는 단계, 및 제한효소에 의한 도입된 제 2 카세트 DNA의 절단 및 돌출 말단의 평활 말단화에 의하여 한쪽 말단 부위에는 삽입시키고자하는 코돈 뉴클레오티드가 삽입되도록 하고 다른쪽 말단에는 트랜스포존 유래의 뉴클레오티드 서열과 목적 DNA의 연속한 3 bp의 뉴클레오티드 서열을 제거하는 단계를 포함할 수 있다.

<39> 본 발명의 무작위 코돈 돌연변이 방법 중 코돈 삽입 돌연변이를 통해 폴리펩티드 및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 진화시키는 방법은 도 2에 나타난 바와 같이, 다음과 같은 단계를 포함한다:

<40> 1) 목적 DNA의 무작위 위치에 트랜스포존(transposon)을 삽입시킨 후, 트랜스포존의 양쪽 말단부위에 있는 제한효소부위를 절단하여 트랜스포존을 제거함으로써 무작위 위치에서 한번 절단된 구조의 목적 이중가닥 DNA들을 얻는 단계,

<41> 2) 목적 DNA의 절단된 양쪽 말단 중 한쪽 말단 부위에 존재하는 트랜스포존 유래의 뉴클레오티드 서열과 트랜스포존 삽입 과정 중 중복 복제된(duplicated) 목적 DNA의 뉴클레오티드 서열을 제거하는 단계,

<42> 3) 2) 단계에서 뉴클레오티드 서열이 제거된 말단 부위에 삽입시키고자하는 코돈 뉴클레오티드를 삽입하고, 목적 DNA의 다른 쪽 말단에서 트랜스포존 유래의 뉴클레오티드 서열을 제거하는 단계,

<43> 4) 3) 단계에서 제조된 목적 DNA의 두 말단을 자가연결(self-ligation)시켜 무작위 위치에서 돌연변이된 라이브러리를 제조하는 단계, 및

<44> 5) 4)의 라이브러리를 적당한 숙주세포에서 발현시킨 후 목적 단백질을 선별하거나 스크리닝하여 원하는 특성을 가진 변이 폴리펩티드 및 이를 암호화하는 변이 폴리뉴클레오티드를 얻는 단계.

<45> 상기 방법에서 2) 단계는 절단된 부위에 제 1 카세트 DNA를 도입하는 단계, 및 제한효소에 의한 카세트 DNA의 절단 및 트랜스포존 삽입 과정 중 중복된 서열이 존재하는 쪽의 돌출 말단의 평활 말단화에 의하여 목적 DNA의 한쪽 말단 부위에 존재하는 트랜스포존 유래의 뉴클레오티드 서열과 트랜스포존 삽입 과정 중 중복 복제된(duplicated) 목적 DNA의 일부 뉴클레오티드 서열을 제거하는 단계를 포함할 수 있다.

<46> 또한 상기 방법에서 3) 단계는 절단된 부위에 삽입시키고자하는 코돈 뉴클레오티드를 포함하는 제 2 카세트 DNA를 도입하는 단계, 및 제한효소에 의한 도입된 제 2 카세트 DNA의 절단 및 돌출 말단의 평활 말단화에 의하여 한쪽 말단 부위에는 삽입시키고자하는 코돈 뉴클레오티드가 삽입되도록 하고 다른쪽 말단에는 트랜스포존 유래의 뉴클레오티드 서열을 제거하는 단계를 포함할 수 있다.

<47> 본 발명의 무작위 코돈 돌연변이 방법 중 코돈 삭제 돌연변이를 통해 폴리펩티드 및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 진화시키는 방법은 도 3에서 나타낸 것 같이, 다음과 같은 단계를 포함한다:

<48> 1) 목적 DNA의 무작위 위치에 트랜스포존(transposon)을 삽입시킨 후, 트랜스포존의 양쪽 말단부위에 있는 제한효소부위를 절단하여 트랜스포존을 제거함으로써 무작위 위치에서 한번 절단된 구조의 목적 이중가닥 DNA들을 얻는 단계,

<49> 2) 목적 DNA의 절단된 양쪽 말단 중 한쪽 말단 부위에 존재하는 트랜스포존 유래의 뉴클레오티드 서열과 트랜스포존 삽입 과정 중 중복 복제된(duplicated) 목적 DNA의 뉴클레오티드 서열 및 목적 DNA의 다른 쪽 말단 부위에 존재하는 트랜스포존 유래의 뉴클레오티드 서열과 목적 DNA의 연속한 3 bp의 뉴클레오티드 서열을 제거하는 단계,

<50> 3) 2) 단계에서 제조된 목적 DNA의 두 말단을 자가연결(self-ligation)시켜 무작위 위치에서 돌연변이된 라이브러리를 제조하는 단계, 및

<51> 4) 3)의 라이브러리를 적당한 숙주세포에서 발현시킨 후 목적 단백질을 선별하거나 스크리닝 하여 원하는 특성을 가진 변이 폴리펩티드 및 이를 암호화하는 변이 폴리뉴클레오티드를 얻는 단계.

<52> 상기 방법에서 2) 단계는 절단된 부위에 제 1 카세트 DNA를 도입하는 단계 및 제한 효소에 의한 카세트 DNA의 절단과 돌출 말단의 평활 말단화에 의하여 목적 DNA의 절단된 양쪽 말단 중 한쪽 말단 부위에 존재하는 트랜스포존 유래의 뉴클레오티드 서열과 트랜스포존 삽입 과정 중 중복 복제된(duplicated) 목적 DNA의 뉴클레오티드 서열 및 목적 DNA의 다른 쪽 말단 부위에 존재하는 트랜스포존 유래의 뉴클레오티드 서열과 목적 DNA의 연속한 3 bp의 뉴클레오티드 서열을 제거하는 단계를 포함할 수 있다.

<53> 또한, 본 발명은 상기 다른 목적에 따라 다음과 같은 단계를 포함하는, 폴리펩티드 및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 진화시키는 방법을 제공한다:

<54> 1) 상기 돌연변이를 통해 폴리펩티드 및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 진화시키는 방법에 의해 선별된 적어도 두 종류 이상의 변이 폴리뉴클레오티드에서 확인된 각각

의 변이 DNA 서열을 하나의 주형 목적 폴리뉴클레오티드에 도입하여 복수의 변이 부위를 갖는 변이 폴리뉴클레오티드를 제조하는 단계, 및

<55> 2) 1) 단계에서 제조된 변이 폴리뉴클레오티드로부터 발현되는 변이 폴리펩티드를 선별하거나 스크리닝하여 원하는 특성을 가진 변이 폴리펩티드 및 이를 암호화하는 변이 폴리뉴클레오티드를 얻는 단계.

<56> 나아가, 본 발명은 상기 또 다른 목적에 따라 상기 방법에 따라 얻어진 복수의 변이 부위를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 목적 DNA로 하여, 본 발명의 무작위 코돈 돌연변이 기법을 통해 폴리펩티드 및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 진화시키는 방법을 반복하는 단계를 포함하는 폴리펩티드 및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 진화시키는 방법을 제공한다.

<57> 본 발명에 따라 무작위 코돈 돌연변이 방법을 이용하여 목적 DNA의 무작위 돌연변이 라이브러리를 제조하는 방법에 대한 각 단계를 보다 상세히 설명하면 다음과 같다.

<58> 단계 1)에서 본 발명의 돌연변이 방법에 이용되는 트랜스포존은 말단 부위에 적당한 제한효소 부위가 있는 트랜스포존을 선택한다. 본 발명에 이용되는 적당한 트랜스포존들로는 말단 부위에 *KpnI* 인식부위가 있는 Tn4430(Hallet, B. et al., *Nucleic Acids Res.* 25:1866-1867, 1997), 말단부위에 *PmeI* 인식부위가 있는 Tn7(Biery, M. C. et al., *Nucleic Acids Res.* 28:1067-1077, 2000), 말단 부위에 *NotI* 인식부위가 있는 Mini-Mu(Taira, S. et al., *Mol. Microbiol.* 34:736-744, 1999) 등이 있다. 이들 트랜스포존들을 목적 DNA에 삽입시키는 방법인 체내 혹은 체외 트랜스포지션(transposition) 현상은 상기의 문헌들(Hallet, B. et al.,

Nucleic Acids Res. 25:1866-1867, 1997; Biery, M. C. et al., *Nucleic Acids Res.* 28:1067-1077, 2000; Taira, S. et al., *Mol. Microbiol.* 34:736-744, 1999) 에서 서술되어 있다.

- <59> 상기의 트랜스포존들이 목적 DNA에 삽입될 때 목적 DNA의 삽입된 부위에는 도 1 내지 도 3에서 보는 바와 같이 삽입된 부위의 일부 목적 DNA의 뉴클레오티드 서열이 중복 복제된다. 상기의 트랜스포존들인 Tn4430, Tn7, Mini-Mu 의 경우 모두 5 bp의 목적 DNA의 뉴클레오티드 서열이 중복 복제된다.
- <60> 목적 DNA는 플라스미드에 삽입되어 있는 상태로 존재할 수 있으며 혹은 DNA 조각일 수도 있다. DNA 조각일 경우 트랜스포존을 삽입하는 방법은 체외 트랜스포지션 방법 (Biery, M. C. et al., *Nucleic Acids Res.* 28:1067-1077, 2000)을 이용한다.
- <61> 목적 DNA가 플라스미드에 들어있는 경우 트랜스포존은 목적 DNA 내부 뿐만이 아니라 플라스미드 부위에도 삽입될 수 있다. 이와 같은 경우 트랜스포존이 목적 DNA에만 삽입된 형태만을 얻기 위해서 적당한 제한효소를 이용하여 목적 DNA를 플라스미드에서 분리한 다음 목적 DNA에 트랜스포존 DNA의 크기가 결합되어 나타나는 DNA 조각을 추출하면 목적 DNA 내부에만 무작위적으로 트랜스포존이 삽입된 형태의 DNA 구조를 얻을 수 있다. 이때, 상기 목적 DNA 내에 트랜스포존 DNA가 삽입된 형태의 DNA 라이브러리는 목적 DNA를 증폭할 수 있는 시발물질들을 이용하여 중합효소 연쇄반응에 의해서 증폭할 수도 있다. 목적 DNA 내 무작위 위치에 트랜스포존 DNA가 도입된 DNA를 적당한 플라스미드 내에 다시 도입시켜 원형의 (circular) DNA 구조로 전환시킨다.

- <62> 트랜스포존의 말단부위에 있는 제한효소 부위를 절단함으로써 목적 DNA에 삽입된 트랜스포존을 제거한다. 이때 목적 DNA의 절단된 양쪽 말단은 도 1 내지 도 3에서 보는 바와 같이 트랜스포존 유래의 일부 제한효소 인식부위와 목적 DNA의 일부 뉴클레오티드 서열이 중복 복제된 부위가 존재한다.
- <63> 단계 2)에서는 이루고자 하는 각 돌연변이 형태에 따라 목적 DNA의 절단된 양쪽 말단 중 한쪽 말단, 혹은 양쪽 말단의 일부 뉴클레오티드 서열을 제거한다. 이를 위해서 절단된 양쪽 말단 사이에 카세트 DNA를 끼워 넣고, 이 카세트 DNA의 말단 부위에 제한효소, 바람직하게는 클래스 IIS 제한효소 인식 부위를 배치하여, 이 제한효소를 이용하여 목적 DNA 말단 부위의 일부 뉴클레오티드 서열을 제거할 수 있다.
- <64> 본 발명에서 사용되는 카세트 DNA는 목적 DNA의 절단된 말단 사이에 끼어 들어가서 목적 DNA의 말단 부위의 일부 서열을 제거하거나, 목적 DNA의 말단 부위에 뉴클레오티드 서열을 삽입시키는데 이용되는 DNA 조각을 통칭한다.
- <65> 카세트 DNA의 구조는 이중가닥 DNA 조각으로 구성되어 있으며 중간 염기서열(spacer)을 사이에 두고 필요에 따라 한쪽 혹은 양쪽 말단 부위에 제한효소, 바람직하게는 클래스 IIS 제한효소(class IIS restriction enzyme) 인식부위가 존재한다.
- <66> 이중가닥 DNA로 구성된 카세트는 그 길이가 길지 않은 경우 이중가닥 DNA 중, 각 가닥의 올리고뉴클레오티드를 합성하여 서로 접합(annealing)시켜 제조할 수 있다. 또한, 카세트의 중간 염기서열에 항생제 저항성을 부여하는 유전자와 같이 그 길이가 수백 뉴클레오티드 이상이 배치되어 카세트의 길이가 긴 경우에는 중간 염기서열에 배치될 DNA를 중합효소 연쇄반응(PCR)을 이용하여 증폭하여 카세트를 제조할 수 있다.

<67> 카세트의 양쪽 말단 부위의 제한효소 인식부위 사이에 존재하는 중간 염기서열은 그 길이가 수 개에서 수천 개의 뉴클레오티드로 구성될 수 있으며, 바람직하게는 20 내지 3,000 bp의 뉴클레오티드로 구성된다. 본 발명의 과정상 목적 DNA에 카세트가 도입된 것을 쉽게 선별하여 얻기 위해서는 경우에 따라 항생제에 저항성을 부여하는 유전자를 중간 염기서열 부위에 배치할 수도 있다. 이때, 항생제에 저항성을 부여하는 유전자는 전사촉진인자(promoter) 부위와 함께 결합되거나 목적 DNA의 전사촉진인자에 의해 발현될 수도 있다.

<68> 본 발명에 이용되는 카세트 DNA에 배치되는 클래스 IIS 제한효소 (class IIS restriction enzyme)는 특정 인식부위 (recognition site)로부터 수 내지 수십 bp 떨어진 염기서열을 절단하는 DNA 엔도뉴클리아제(endonuclease)로서 절단부위의 염기서열 특이성이 없는 제한효소이다 (도 4 참조). 클래스 IIS 제한효소는 각기 특이적인 인식부위의 염기서열을 인지하고 인식부위로부터 하위 (downstream)의 일정한 거리에 위치한 부위를 절단하여 대부분 5'-말단이 돌출되거나 3'-말단이 돌출된 형태의 DNA 절편을 만든다.

<69> 카세트 내에 배치될 특정 제한효소 인식부위는 목적 DNA 내에 존재하지 않아야 하며, 만약 이용될 제한효소 인식부위가 목적 DNA 내에 존재하는 경우에는 목적 DNA 내 상기 부위를 부위-특이 돌연변이 방법을 이용하여 바꾸거나 적절한 다른 클래스 IIS 제한효소를 이용한다.

<70> 클래스 IIS 제한효소에 의해 절단된 부위는 필요에 따라 평활말단(blunt-end)으로 전환될 수 있다. 절단된 부위가 5'-말단이 돌출된 경우 이를 평활말단으로 전환시키기 위해서는 클레노우 DNA 중합효소 (Klenow DNA polymerase), 멍 빈 뉴클리아제 (Mung

Bean nuclease), S1 뉴클리아제 등의 효소가 이용될 수 있으나, 본 발명에서는 클레노우 DNA 중합효소에 의한 갭 메꾸기 (gap-filling) 반응이 더 선호된다. 3'-말단이 돌출된 경우 이를 평활말단으로 전환시키기 위해서는 T4 DNA 중합효소 (T4 DNA polymerase), 클레노우 DNA 중합효소, 멍 빈 뉴클리아제, S1 뉴클리아제 등의 효소가 이용될 수 있으나, 본 발명에서는 T4 DNA 중합효소의 3'→5' 방향의 엑소뉴클리아제 활성을 이용한 3'-돌출 말단 제거반응이 더 선호된다.

<71> 목적 DNA의 코돈 치환 또는 삽입 돌연변이의 경우, 단계 3)에서는 목적 DNA의 절단된 부위에 제 2 카세트 DNA를 도입한다. 카세트 DNA는 단계 2)에서와 동일하게 정의된다. 구체적으로 목적 DNA의 코돈 치환 돌연변이의 경우에는 카세트의 한쪽 말단에는 목적 DNA에 삽입되는 코돈 염기서열 및 이것을 목적 DNA에 삽입할 수 있도록 제한효소, 바람직하게는 클래스 IIS 제한효소 인식부위가 배치되고 다른 쪽 말단은 트랜스포존 유래의 뉴클레오티드 서열과 목적 DNA의 3 bp까지를 제거할 수 있도록 제한효소, 바람직하게는 클래스 IIS 제한효소 인식부위가 배치된다 (도 1 참조).

<72> 또한, 목적 DNA의 코돈 삽입 돌연변이의 경우에는 카세트의 한쪽 말단에는 목적 DNA에 삽입되는 코돈 염기서열 및 이것을 목적 DNA에 삽입할 수 있도록 제한효소, 바람직하게는 클래스 IIS 제한효소 인식부위가 배치되고 다른 쪽 말단은 트랜스포존 유래의 뉴클레오티드 서열을 제거할 수 있도록 제한효소, 바람직하게는 클래스 IIS 제한효소 인식부위가 배치된다 (도 2 참조).

<73> 목적 DNA에 치환이나 혹은 삽입을 위하여 카세트에 배치되는 코돈 뉴클레오티드 서열은 도 1의 경우처럼 특정된 코돈이거나 도 2의 경우처럼 무작위 코돈이 배치될 수 있다.

- <74> 목적 DNA 내에 도입된 제 2 카세트 DNA는 카세트 DNA 내의 제한효소 부위를 인지하는 제한효소로 절단하여 목적 DNA에 삽입될 일부 뉴클레오티드만을 남기고 목적 DNA로부터 다시 분리시킨다. 이때, 목적 DNA의 절단부위는 대부분 5'-말단이나 3'-말단이 돌출된 형태로 만들어지며 돌출된 말단은 상기의 단계 2)에서 서술한 방법들에 의해 평활말단으로 전환된다.
- <75> 단계 4)(목적 DNA의 코돈 삭제 돌연변이의 경우에는 단계 3)에서는 평활 말단화된 양쪽 말단 부위를 리가제(ligase)를 이용하여 자가 연결(self- ligation) 시켜 무작위 위치에서 코돈 돌연변이된 라이브러리를 제조한다.
- <76> 단계 4)(목적 DNA의 코돈 삭제 돌연변이의 경우에는 단계 3)까지의 과정들을 거치면서 본 발명의 무작위 코돈 돌연변이 방법에 의해 만들어지는 목적 DNA의 형태는 무작위 위치에서 코돈 뉴클레오티드 서열이 목적 DNA 내에 끼어들거나 또는 목적 DNA의 무작위 위치에서 연속한 3 bp 뉴클레오티드 서열이 삭제되어 나타나는 돌연변이 라이브러리이다. 이때, 목적 DNA에 끼어 들어가는 3 bp 길이 만큼의 뉴클레오티드 서열이 목적 DNA에서 삭제된다면 치환 돌연변이 라이브러리가 만들어지게 되고, 목적 DNA에 코돈 뉴클레오티드 서열의 삽입 없이 단지 목적 DNA의 뉴클레오티드 서열이 삭제된다면 삭제 돌연변이 라이브러리가 만들어지고, 목적 DNA에서 삭제되는 뉴클레오티드 서열이 없이 코돈 뉴클레오티드 서열만 삽입되면 삽입 돌연변이 라이브러리가 만들어진다. 도 1, 도 2 및 도 3은 각각 본 발명에 의해 이루어지는 치환, 삽입 및 삭제 돌연변이 제조방법의 예를 도시한 것이다
- <77> 단계 5)(목적 DNA의 코돈 삭제 돌연변이의 경우에는 단계 4)에서는 상기 단계들을 거쳐 제조된 목적 DNA의 무작위 돌연변이 라이브러리를 발현시키고 원하는 성질을 가진

폴리펩티드를 선별하거나 스크리닝하여 원하는 특성을 가진 변이 폴리펩티드 및 이를 암호화하는 변이 폴리뉴클레오티드를 얻는 단계를 포함하는 단백질의 방향적 진화 방법을 제공한다.

<78> 구체적으로, 상기 단백질 진화 방법은 제조된 이중가닥의 돌연변이 DNA를 발현벡터에 삽입하고 상기 발현벡터를 발현세포에 도입하여 복수의 클론을 함유하는 라이브러리를 제조하여 이들 클론들로부터 폴리뉴클레오티드를 발현시켜 원하는 단백질을 스크리닝한다.

<79> 적당한 발현방법으로는 세포 내에서 유전자 생성물을 제조 또는 축적하는 것, 유전자 생성물을 세포 밖으로 분비시키고 이들을 배지 내에 축적하는 것, 및 유전자 생성물이 페리플라즘(periplasm) 속으로 분비되는 것 등이 포함된다. 상기 재조합 DNA 라이브러리 제조에 있어서 발현벡터는 선택된 숙주 내에서 작용하는 어떠한 벡터도 사용가능한데, 예컨대 당업계에서 공지된 통상적인 발현벡터인 파아지 (phage), 플라스미드 (plasmid), 파아지미드 (phagemid), 바이러스 벡터 (viral vector), 인공염색체 (artificial chromosome) 등이 이용될 수 있다. 발현벡터를 구축하는 방법은 공지되어 있고, 예컨대 문헌 (Joseph Sambrook and David W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y., 2001)에 개시되어 있다. 그렇게 하여 제조된 발현벡터는 숙주세포를 형질전환시킬 수 있다. 재조합 DNA의 적당한 발현세포로는 대장균 (*E. coli*), 고초균 (*B. subtilis*), 바실러스 브레비스 (*B. brevis*)와 같은 세균, 스트렙토마이세스 리비단스 (*S. lividans*)와 같은 방선균류, 사카로미세스 세레비시애 (

S. cerevisiae)와 같은 효모, 아스퍼질러스 오리자에 (*A. oryzae*), 아스퍼질러스 니둘란스 (*A. nidulans*) 및 아스퍼질러스 니거 (*A. niger*)와 같은 곰팡이, COS-7, CHO, Vero, 생쥐 L 세포와 같은 동물세포, 곤충세포, 또는 식물세포 등이 이용될 수 있다.

<80> 본 발명의 방법에 의해 제조되는 돌연변이 DNA는 효소, 항체, 백신 (항원), 호르몬, 흡착단백질, 혈장단백질 등과 같은 다양한 단백질 암호화 유전자일 수 있다. 예컨대, 상기 돌연변이 DNA는 효소를 암호화하는 것일 수 있으며, 상기 효소는 가수분해효소 (hydrolase), 분해효소 (lyase), 전달효소 (transferase), 산화환원효소 (oxidoreductase), 연결효소 (ligase) 및 이성화효소 (isomerase)로 구성된 군으로부터 선택된 것일 수 있다.

<81> 돌연변이 라이브러리의 스크리닝을 통해 원하는 성질을 가진 변이 단백질을 얻게 되면 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 염기서열 분석을 통해 변이 부위를 확인할 수 있다.

<82> 따라서, 본 발명의 돌연변이 방법에 의해 제조된 돌연변이 라이브러리로부터 스크리닝을 통해 원하는 성질을 가진 변이 폴리뉴클레오티드를 선발하고 이들 변이체의 염기서열 분석을 통해 변이 부위를 확인한 후에 이들 돌연변이체에 각각 존재하는 변이 부위를 하나의 주형 (template) 목적 DNA에 모두 또는 일부를 모으게 되면 각각의 독립된 돌연변이체보다 원하는 방향으로 훨씬 성질이 개선된 변이 단백질을 얻을 수 있게 된다. 각각의 돌연변이체에 존재하는 각 변이 부위들을 하나의 주형 목적 DNA에 도입하는 과정은 각 변이 부위 사이에 존재하는 특정 제한효소 부위를 절단하여 연결 (ligation)하거나 순차적 부위-특이 돌연변이 방법을 이용하거나, 중합효소 연쇄반응을 이용하여 변이 부위를 연결하는 등 통상의 분자생물학적인 방법에 의해 제조가 가능하다.

- <83> 위와 같은 과정을 통해 얻은 변이 폴리뉴클레오티드를 다시 목적 DNA로 사용하여 본 발명의 돌연변이 방법에 의한 돌연변이 라이브러리 제조와 스크리닝 등 상기의 과정을 다시 반복함으로써 훨씬 더 성질이 진화된 변이 단백질을 얻을 수도 있다.
- <84> 본 발명의 무작위 코돈 돌연변이 방법은 기존의 폴리펩티드의 개량에 이용되는 다른 돌연변이 방법들에 비해 다음과 같은 장점들을 가지고 있다.
- <85> 본 발명의 돌연변이 방법은 목적 DNA가 암호화하는 폴리펩티드 개개의 아미노산 잔기에 대하여 모든 가능한 아미노산으로의 치환을 유발시킬 수 있다.
- <86> 또한, 본 발명의 무작위 돌연변이 방법에서는 카세트 DNA 내에 도입된 코돈 뉴클레오티드 서열이 목적 DNA 내에서 한군데에서만 삽입 또는 치환되거나, 목적 DNA 내 연속한 3 bp 뉴클레오티드 서열이 무작위 위치에서 한군데에서만 삭제되므로 목적 단백질을 암호화하는 목적 DNA는 단지 한 부위에서만 돌연변이가 발생하게 된다. 이는 에러-유발성 중합효소 연쇄반응 (error-prone PCR)이나 화학적 돌연변이 방법 (chemical mutagenesis)과 같은 무작위 돌연변이 방법에서처럼 에러율 (error-rate)의 조절에 따라 복수의 위치에서 돌연변이가 발생할 수 있어서 이로운 돌연변이 (beneficial mutations)와 해로운 돌연변이 (deleterious mutations)가 혼재할 수 있는 경우와는 달리 에러율의 조절 없이 간편하게 이용할 수 있다.
- <87> 또한, 본 발명에서는 올리고뉴클레오티드를 이용한 부위-특이 돌연변이 방법이나 포화 돌연변이 방법처럼 목적 DNA 상의 각각의 위치에 돌연변이를 유발시키기 위하여 각 부위에 특이적인 돌연변이 유발성 올리고뉴클레오티드 (mutagenic oligonucleotide)를 따로 합성할 필요가 없기 때문에 경제적이며, 또한 각각의 위치에 독립적인 돌연변이 반

응을 실행해야 하는 번거로움 없이 돌연변이 라이브러리를 제조할 수 있어 간편하게 이용할 수 있다.

<88> 나아가, 본 발명의 돌연변이 방법은 부위-특이 돌연변이 방법이나 포화 돌연변이 방법과는 달리 과정상 목적 DNA에 접합이 필요한 돌연변이 유발성 올리고뉴클레오타이드를 필요로 하지 않기 때문에 돌연변이를 유발시키고자 하는 목적 DNA의 염기서열 정보가 없어도 이용할 수 있다.

<89> 더욱이, 목적 단백질의 방향적 진화를 위한 통상의 돌연변이 방법들은 대개 목적 폴리펩티드 내 아미노산 잔기의 치환을 유발시키는 방법들인데 비하여 본 발명의 돌연변이 방법은 무작위 위치에서의 아미노산 치환뿐만 아니라 삽입과 삭제를 유발시킬 수 있어서 목적 단백질의 방향적 진화에 보다 유용하게 이용할 수 있다.

<90> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<91> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<92> <실시예 1> 무작위 코돈 돌연변이 방법을 이용한 키토산아제의 치환 돌연변이 라이브러리의 제조

<93> (단계 1) 키토산아제 유전자의 무작위 위치에 트랜스포존의 삽입 및 제거

<94> 바실러스 속 KCTC 0377BP 균주에서 유래된 키토산아제 유전자 (Genebank 등재번호: AF334682)를 정방향 시발물질 csn-n1 (5-AAAACTGCAGCATTTTATGTAGTAAGC-3; 서열번호: 1) 과 역방향 시발물질 csn-c1 (5-CCGGAATTCGTATGCTAATTCCC-3; 서열번호: 2)을 이용하여 증합효소 연쇄반응을 통해 증폭하였다. 증폭된 DNA 조각을 제한효소

Pst I과 *EcoR* I으로 절단하여 약 1.4 kb의 유전자 절편을 얻고 이를 pUC19 (New England Biolabs사) 플라스미드의 동일 제한효소 절단 부위에 연결한 후 상기 재조합 플라스미드를 pBC17이라 명명하였다.

<95> Tn7에 바탕을 둔 트랜스포존을 pBC17 플라스미드에 삽입시키기 위해 GPS-LS 링커-스캐닝 시스템(linker-scanning system, New England Biolabs사)을 이용하였다. 제조사가 추천하는 방법을 이용하여 pBC17 플라스미드에 Transprimer-5 (New England Biolabs사)을 삽입시킨 후 이 반응 플라스미드로 대장균 DH5 α 균주 (Takara사)를 형질전환(transformation)시켜서 카나마이신이 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 앰피실린이 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 들어있는 LB-한천 배지에 도말하였다. 여기서 자란 콜로니들을 긁어 모아 쿼이프랩 스핀 미니프랩 방법 (Qiaprep Spin Miniprep, Qiagen사)을 통해 플라스미드 DNA를 추출하였다. 추출된 플라스미드 DNA를 제한효소 *EcoR* I 및 *Pst* I으로 절단하여 트랜스포존이 목적 DNA (키토산아제 유전자)에 삽입된 약 3.2 kb 크기의 절편들만 아가로스 겔로부터 회수하여 동일한 제한효소로 절단한 pUC19 벡터에 T4 DNA 연결효소를 이용하여 도입하였다.

<96> 목적 DNA 내에 삽입된 트랜스포존을 제거하기 위해 트랜스포존의 말단 부위를 인지하는 *Pme* I (New England BioLabs사)을 처리하고 절단된 부위의 5'-말단의 인산기를 제거하기 위하여 송아지 장 포스파타제 (calf intestinal phosphatase, Roche 사)을 처리하였다. 그 후에 약 4.2 kb 크기의 절편들을 0.8% 아가로스 겔로부터 겔 추출 키트 (Gel extraction kit, Qiagen사)를 사용하여 회수하였다. 이렇게 하여 제조된 플라스미드 DNA를 pBC17- Δ Tn으로 명명하였다.

<97> (단계 2) 키토산아제 유전자의 절단된 양쪽 말단 중 한쪽 말단 부위에 존재하는 트랜스포존 유래의 뉴클레오티드 서열과 트랜스포존 삽입 과정 중 중복 복제된(duplicated) 목적 DNA의 뉴클레오티드 서열의 제거

<98> 목적 DNA의 절단 부위에 삽입될 제 1 카세트 DNA를 제조하기 위하여, 5'-말단이 인산화된 정방향 시발물질 bam-fp (5'- GGATCCTATGTATCCGCTCATGAGACAATAACC-3'; 서열번호: 3)과 역방향 시발물질 del-rp (5'-GGCATTCTGCACTCTTCACCTAGATCCTTTTTGATCAG-3'; 서열번호: 4)를 합성하였다. pBC KS+ 플라스미드 DNA를 주형으로 하고, bam-fp와 del-rp 시발물질을 이용하여 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 원형의 pBC KS+ 플라스미드 DNA 15 ng, 0.2 mM 각 dNTP, 2 mM MgSO₄, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.1% 트리톤 X-100, 2 단위 벤트 DNA 중합효소 (New England BioLabs사) 및 0.5 μ M의 시발물질을 혼합한 후 최종 부피 100 μ l의 반응 혼합물을 제조하였다. 상기 혼합물을 94°C에서 3분 동안 변성시킨 후 94°C 30초, 58°C 30초, 72°C 1분의 반응을 30회 반복한 다음 72°C에서 5분 동안 마지막으로 증폭시키는 조건으로 써멀 사이클러 (PTC-101 Thermal cycler, MJ Research사)를 이용하여 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 중합효소 연쇄반응에 의해 제조된 카세트를 0.8% 아가로스 겔에 전기영동한 후, DNA 절편 밴드들을 겔로부터 내려내어 진클린 키트 (GENECLEAN Kit, Bio 101사)로 정제하였다.

<99> 정제된 제 1 카세트 DNA를 단계 2에서 제조된 pBC17- Δ Tn에 T4 DNA 연결효소를 이용하여 도입하였다. 연결효소 반응은 1 μ g의 pBC17- Δ Tn DNA, 1 μ g 카세트 DNA, 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 5% (w/v) 폴리에틸렌 글리콜-8000 (polyethylene glycol-8000), 3 단위 연결효소 (Gibco BRL사)를 포함하는 총 30 μ l의 혼합물을 25°C에서 12시간 동안 반응시켰다. 연결 반응물을 이용하여 대장균 DH5

α 균주(Takara사)를 형질전환(transformation)시켜서 클로람페니콜이 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 들어있는 LB-한천 배지에 도말하였다. 여기서 자란 콜로니들을 긁어 모아 쿼이프랩 스피ن 미니프랩 방법 (Qiaprep Spin Miniprep, Qiagen사)을 통해 플라스미드 DNA를 추출하였다. 추출한 플라스미드 DNA를 제한효소 *Bsg* I으로 절단한 다음 3'-말단이 돌출된 부분을 T4 DNA 중합효소 (New England BioLabs사)를 이용하여 제거하고 다시 이 플라스미드 DNA들을 *Bam*H I으로 절단하여 제 1 카세트 DNA가 목적 DNA (키토산아제 유전자)에서 제거된 약 4.2 kb 크기의 절편들만 아가로스 겔로부터 회수하였다. 이렇게 제조된 DNA들을 pBC17- Δ CAS1으로 명명하였다.

<100> (단계 3) 코돈 뉴클레오티드 삽입 및 목적 DNA의 다른 쪽 말단의 트랜스포존 유래 뉴클레오티드 서열과 목적 DNA의 연속한 3 bp의 뉴클레오티드 서열 제거

<101> 목적 DNA의 절단 부위에 삽입될 제 2 카세트 DNA를 제조하기 위하여, 5'-말단이 인산화된 정방향 시발물질 bsg-sf (5'- CGGGATCCTTCTGCACTATGTATCCGCTCATGAGACAATAACC-3'; 서열번호: 5)과 역방향 시발물질 bsg-sr (5'-NNNACGTCAATTACGGATCCTGCACTCTTCACCTAGATCCTTTTTGATC-3'; 서열번호: 6)을 합성하였다. pBC KS+ 플라스미드 DNA를 주형으로 하고, bsg-sf와 bsg-sr 시발물질을 이용하여 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 중합효소 연쇄반응에 의해 제조된 카세트를 0.8% 아가로스 겔에 전기영동한 후, DNA 절편 밴드들을 겔로부터 내려내어 진클린 키트 (GENECLEAN Kit, Bio 101사)로 정제하였다. 정제된 제 2 카세트 DNA를

*Bam*H I으로절단한 후 카세트 DNA를 상기 단계 3에서 제 1 카세트 DNA를 제거하여 만든 pBC17-△CAS1 플라스미드의 절단된 부위에 T4 DNA 연결효소를 이용하여 도입하였다. 연결효소 반응은 1 μ g의 pBC17-△CAS1 DNA, 1 μ g 카세트 DNA, 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 5% (w/v) 폴리에틸렌 글리콜-8000 (polyethylene glycol-8000), 3 단위 연결효소 (Gibco BRL사)를 포함하는 총 30 μ l의 혼합물을 25℃에서 12시간 동안 반응시켰다. 연결 반응물을 이용하여 대장균 DH5 α 균주(Takara사)를 형질전환(transformation)시켜서 클로람페니콜이 20 μ g/ml의 농도로 들어있는 LB-한천 배지에 도말하였다. 여기서 자란 콜로니들을 긁어 모아 쿼이프랩 스핀 미니프랩 방법 (Qiaprep Spin Miniprep, Qiagen사)을 통해 플라스미드 DNA를 추출하였다. 추출한 플라스미드 DNA를 제한효소 *Bsg* I으로 절단하였다.

<102> 상기의 제한효소에 의해 제 2 카세트 DNA가 제거된 약 4.1 kb DNA 절편들의 절단부위는 3'-말단이 돌출된 형태로 만들어지며 이러한 돌출말단을 제거하여 목적 유전자 (키토산아제의 유전자)의 무작위 위치에서 3개의 뉴클레오티드가 제거되고, 제거된 위치에 무작위 뉴클레오티드가 도입된 돌연변이 라이브러리를 제조하였다. 돌출된 3'-말단을 제거하여 평활말단으로 전환시키기 위해서 T4 DNA 중합효소 (New England BioLabs사)를 처리하였다. *Bsg*I에 의해 카세트가 절단된 DNA 절편 0.5 μ g, 50 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 100 M 각 dNTP, 1 단위 T4 DNA 중합효소를 포함하는 총 30 μ l의 혼합물을 12℃에서 20분 동안 반응시켜 평활말단 구조로 전환시킨 후 75℃에서 10분 동안 정치함으로써 T4 DNA 중합효소를 불활성화시켰다.

<103> (단계 4) 목적 DNA의 두 말단을 자가연결(self-ligation)시켜 돌연변이된 라이브러리 제조

- <104> 상기의 과정으로 한쪽 말단에는 목적 DNA에 삽입될 염기서열을 보유하고, 다른 한쪽 말단에는 3개의 뉴클레오티드가 제거된 목적 DNA를 DNA 연결효소를 이용하여 자가접합 (self-ligation)시켰다. 연결효소 반응은 목적 DNA 0.5 μ g, 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 5% (w/v) 폴리에틸렌 글리콜-8000, 1 단위 연결효소를 포함하는 총 30 μ l의 혼합물을 25°C에서 12시간 동안 반응시켰다.
- <105> 상기의 연결반응물을 이용하여 대장균 JM105 균주 (Amersham Pharmacia Biotech사)를 형질전환시켜서 앰피실린이 100 μ g/ml의 농도로 들어 있는 LB-한천 배지에 도말한 후 37°C에서 18시간 동안 배양함으로써 최종적으로 키토산아제 유전자의 무작위 치환 돌연변이 라이브러리를 제조하였다.
- <106> 상기 라이브러리로부터 5개의 콜로니를 무작위로 선별하여 쿼이프랩 스핀 미니프랩 방법 (Qiaprep Spin Miniprep, Qiagen사)을 통해 플라스미드 DNA를 추출하여 돌연변이된 유전자 부위의 염기서열을 분석하였다.
- <107> 하기 표 1은 키토산아제 유전자의 무작위 코돈 돌연변이 방법을 이용하여 제조된 치환 돌연변이 라이브러리로부터 무작위로 선별된 돌연변이 유전자들의 염기서열을 분석한 것으로, 각 아미노산 잔기의 코돈 뉴클레오티드 서열 중 밑줄 친 뉴클레오티드는 치환이 일어난 위치를 표시한 것이다.

<108>

【표 1】

변이 키토산아제 유전자	아미노산 서열 및 코돈 뉴클레오티드 서열의 변화
rcm-s1	Val ⁴² (GTT) → Glu ⁴² (GAG)
rcm-s2	Ala ¹⁹ (GCT) → Gly ¹⁹ (CCA)
rcm-s3	Thr ¹³¹ (ACA), Val ¹³² (GTA) → Asn ¹³¹ (AAT), Leu ¹³² (CTA)
rcm-s4	Trp ³⁹⁷ (TGG) → Gly ³⁹⁷ (GGG)
rcm-s5	Ile ³²⁷ (ATT) → Asp ³²⁷ (GAC)

<109> <실시예 2> 무작위 코돈 돌연변이 방법을 이용한 키토산아제의 삽입 돌연변이 라이브러리의 제조

<110> 실시예 1의 (단계 3)에서 제 2 카세트 DNA를 제조하기 위해 이용되는 시발물질 중, 정방향 시발물질은 bsg-if (5'-CGGGATCCTTGCACTGCACTATGTATCCGCTCATGAGACAATAACC-3'; 서열번호: 7)를 이용하는 것 이외에는 상기 실시예 1과 동일한 방법을 이용하여 목적 DNA (키토산아제 유전자)의 무작위 위치에서 무작위 염기서열(NNN)이 삽입된 돌연변이 라이브러리를 제조하였다.

<111> 최종 무작위 삽입 라이브러리로부터 4개의 콜로니를 무작위로 선별하여 퀴아젠 스펀 미니프랩 방법 (Qiagen사)을 통해 플라스미드 DNA를 추출하여 돌연변이된 유전자 부위의 염기서열을 분석하였다.

<112> 하기 표 2는 키토산아제 유전자의 무작위 코돈 돌연변이 방법을 이용하여 제조된 삽입 돌연변이 라이브러리로부터 무작위로 선발된 돌연변이 유전자들의 염기서열을 분석한 것으로, 각 아미노산 잔기의 코돈 뉴클레오티드 서열 사이에 ▽ 표시는 축퇴성 뉴클

레오티드의 삽입이 일어난 위치를 표시한 것이고, 아미노산 잔기의 코돈 뉴클레오티드 서열 중 밑줄 친 뉴클레오티드는 삽입된 뉴클레오티드를 표시한 것이다.

<113> 【표 2】

변이 키토산아제 유전자	아미노산 서열 및 코돈 뉴클레오티드 서열의 변화
rsm-i1	Tyr ³⁶⁵ (TA [▽] T) → Tyr ³⁶⁵ (TAT), His ³⁶⁶ (CAT)
rsm-i2	Gln ¹⁵⁹ (CAA [▽]) → Gln ¹⁵⁹ (CAA [▽]), Ser ¹⁶⁰ (AGC)
rsm-i3	Asn ²³¹ (AAT [▽]) → Asn ²³¹ (AAT [▽]), Ile ²³² (ATA)
rsm-i4	Tyr ²⁷³ (T [▽] AC) → Ser ²⁷³ (TCC), Tyr ²⁷⁴ (TAC)

<114> <실시예 3> 무작위 코돈 돌연변이 방법을 이용한 키토산아제의 삭제 돌연변이 라이브러리의 제조

<115> 상기 실시예 1의 단계 1과 동일한 방법을 이용하여 키토산아제 유전자의 무작위 위치에 트랜스포존을 삽입시킨후 제거하여 무작위 위치에서 한번 절단된 구조의 키토산아제 유전자들 (pBC17-△Tn)을 얻었다.

<116> 단계 2)에서는 목적 DNA의 절단 부위에 삽입될 카세트 DNA를 제조하기 위하여, 5'-말단이 인산화된 정방향 시발물질 bsg-df (5'-GCTACGCACTGCACTATGTATCCGCTCATGAGACAATAACC-3'; 서열번호: 8)과 역방향 시발물질 bsg-dr (5'-GGCATTCTGCACTCTTCACCTAGATCCTTTTGTATCAG-3'; 서열번호: 9)을 합성하였다. pBC KS+ 플라스미드 DNA를 주형으로 하고, bsg-df와 bsg-dr 시발물질을 이용하여 실시예 1의 단계 3과 동일하게 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 중합효소 연쇄반응에 의해 제조된 카세트를 0.8% 아가로스 겔에 전기영동한 후, DNA 절편 밴드들을 겔로부터 내려 내어 진클린 키트 (GENECLEAN Kit, Bio 101사)로 정제하였다.

<117> 정제된 카세트 DNA를 단계 1에서 얻은 트랜스포존이 제거된 pBC17- Δ Tn 플라스미드에 T4 DNA 연결효소를 이용하여 도입하였다. 연결효소 반응은 1 μ g의 pBC17- Δ Tn DNA, 1 μ g 카세트 DNA, 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 5% (w/v) 폴리에틸렌 글리콜-8000 (polyethylene glycol-8000), 3 단위 연결효소 (Gibco BRL사)를 포함하는 총 30 μ l의 혼합물을 25°C에서 12시간 동안 반응시켰다. 연결 반응물을 이용하여 대장균 DH5 α 균주 (Takara사)를 형질전환 (transformation)시켜서 클로람페니콜이 20 μ g/ml의 농도로 들어있는 LB-한천 배지에 도말하였다. 여기서 자란 콜로니를 긁어 모아 쿼이프랩 스핀 미니프랩 방법 (Qiaprep Spin Miniprep, Qiagen사)을 통해 플라스미드 DNA를 추출하였다. 추출한 플라스미드 DNA를 제한효소 Bsg I으로 절단하였다.

<118> 상기의 제한효소에 의해 카세트 DNA가 제거된 약 4.1 kb DNA 절편들의 절단부위는 3'-말단이 돌출된 형태로 만들어지며 이러한 돌출말단을 제거하여 목적 유전자 (키토산 아제의 유전자)의 무작위 위치에서 3개의 뉴클레오티드가 제거된 돌연변이 라이브러리를 제조하였다. 돌출된 3'-말단을 제거하여 평활말단으로 전환시키기 위해서 T4 DNA 중합효소 (New England BioLabs사)를 처리하였다. BsgI에 의해 카세트가 절단된 DNA 절편 0.5 μ g, 50 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 100 M 각 dNTP, 1 단위 T4 DNA 중합효소를 포함하는 총 30 μ l의 혼합물을 12°C에서 20분 동안 반응시켜 평활말단 구조로 전환시킨 후 75°C에서 10분 동안 정치함으로써 T4 DNA 중합효소를 불활성화시켰다.

<119> 단계 3)에서는 상기의 과정으로 한쪽 말단에 3개의 뉴클레오티드가 제거된 목적 DNA를 DNA 연결효소를 이용하여 실시예 1의 단계 4와 동일한 방법으로 자가접합

(self-ligation)시키고 최종적으로 키토산아제 유전자의 무작위 삭제 돌연변이 라이브러리를 제조하였다.

<120> 상기 라이브러리로부터 5개의 콜로니를 무작위로 선별하여 쿼이프렙 스핀 미니프렙 방법 (Qiaprep Spin Miniprep, Qiagen사)을 통해 플라스미드 DNA를 추출하여 돌연변이된 유전자 부위의 염기서열을 분석하였다.

<121> 하기 표 3은 키토산아제 유전자의 무작위 코돈 돌연변이 방법을 이용하여 제조된 삭제 돌연변이 라이브러리로부터 무작위로 선발된 돌연변이 유전자들의 염기서열을 분석한 것으로, 각 아미노산 잔기의 코돈 뉴클레오티드 서열 중 밑줄 친 뉴클레오티드는 삭제가 일어난 위치를 표시한 것이고 △는 해당 아미노산 잔기의 삭제를 표시한 것이다.

<122> 【표 3】

변이 키토산아제 유전자	아미노산 서열 및 코돈 뉴클레오티드 서열의 변화
rcm-d1	Trp ³⁹⁷ (<u>TGG</u>) → △Trp ³⁹⁷
rcm-d2	Arg ³³⁸ (<u>AGA</u>) → △Arg ³³⁸
rcm-d3	Gln ⁷² (<u>CAG</u>), Glu ⁷³ (<u>GAA</u>) → Gln ⁷² (CAA)
rcm-d4	Gly ¹²⁵ (<u>GGG</u>), Tyr ¹²⁶ (<u>TAT</u>) → Gly ¹²⁵ (GGT)

<123> <실시예 4> 무작위 코돈 돌연변이 방법을 이용한 키토산아제의 열안정성 향상

<124> 상기 실시예 1에서 제조된 무작위 치환 돌연변이 라이브러리를 이용하여 내열성이 증진된 키토산아제를 스크리닝하였다. 먼저 라이브러리상의 형질전환 콜로니를 다시 앰피실린이 100 µg/ml의 농도로 들어있는 LB-한천 배지에 옮겨 찍은 후 37℃에서 20시간 동안 정치 배양하였다. 상기 LB-한천 플레이트를 70℃의 수조에 15분 동안 올려놓아 열처리한 후 50 mM의 Na-아세테이트 완충용액에 0.1%의 키토산과 1%의 아가로스를 녹인 용

액을 LB-한천배지 위에 부가하였다. 상기 LB-한천 배지를 37℃에서 24시간 동안 정지 배양한 후 0.2% 콩고 레드 (Congo red) 염색시약을 이용해 키토산이 분해되어 투명환을 생성하는 콜로니들을 선발하였다. 상기와 같은 과정을 통해 야생형보다 열안정성이 증진된 3개의 클론을 선발하였다. 이들 클론으로부터 퀴아젠 스피ن 미니프랩 방법 (Qiagen사)을 통해 플라스미드 DNA를 추출하고 각 플라스미드 DNA에서 키토산아제 유전자 부위의 염기서열을 분석하였다.

<125> 하기 표 4는 무작위 코돈 돌연변이 방법을 이용하여 얻어진 내열성이 향상된 돌연변이 키토산아제 유전자의 염기서열을 분석한 것으로, 각 아미노산 잔기의 코돈 뉴클레오티드 서열 중 밑줄 친 뉴클레오티드는 치환이 일어난 위치를 표시한 것이다.

<126> 【표 4】

변이 키토산아제 유전자	아미노산 서열 및 코돈 뉴클레오티드 서열의 변화
rcm-t1(N368E)	Asn ³⁶⁸ (<u>AAT</u>) → Glu ³⁶⁸ (<u>GAG</u>)
rcm-t2(N297S)	Asn ²⁹⁷ (<u>AAC</u>) → Ser ²⁹⁷ (<u>AGT</u>)
rcm-t3(Q159R)	Gln ¹⁵⁹ (<u>CAA</u>) → Arg ¹⁵⁹ (<u>CGT</u>)

<127> 돌연변이 키토산아제 유전자들의 염기서열 분석으로부터 확인된 각각의 변이 부위를 퀵체인지 부위-특이적 돌연변이 유발 키트(QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kits, Stratagene사)를 이용한 순차적 부위특이 돌연변이 기법을 이용하여 하나의 키토산아제 유전자에 모두 도입하였다. 이렇게 하여 제조된 삼중 돌연변이 및 각 단일 돌연변이 키토산아제의 재조합 대장균 균주를 LB 배지에서 37℃에서 24시간 동안 배양한 후

배양액의 원심분리를 통해 배양 상등액을 얻고 이를 이용하여 각 돌연변이체 키토산아제들의 열안정성을 측정하였다.

<128> 하기 표 5는 각 돌연변이체 키토산아제들을 55℃에서 30분 동안 열처리한 후 처리전과 비교하여 남아있는 잔존 활성을 야생형과 비교한 결과이다.

<129> 【표 5】

키토산아제	잔존 활성 (%)
야생형	43.2
Rcm-t1(N368E)	78.2
Rcm-t2(N297S)	54.3
Rcm-t3(Q159R)	74.6
Rcm-t4(N378E+N297S+Q159R)	94.2

<130> 본 발명의 무작위 돌연변이체들의 열안정성이 야생형에 비하여 향상되었으며, 특히 삼중 돌연변이체의 열안정성이 현저히 향상되었다.

【발명의 효과】

<131> 본 발명의 돌연변이 방법을 이용하면 원하는 방향으로 성질이 개선된 유용한 돌연변이 단백질 및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 용이하게 얻을 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

다음과 같은 단계를 포함하는, 폴리펩티드 및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 진화시키는 방법:

- 1) 목적 DNA의 무작위 위치에 트랜스포존(transposon)을 삽입시킨 후, 트랜스포존의 양쪽 말단부위에 있는 제한효소부위를 절단하여 트랜스포존을 제거함으로써 무작위 위치에서 한번 절단된 구조의 목적 이중가닥 DNA들을 얻는 단계,
- 2) 목적 DNA의 절단된 양쪽 말단 중 한쪽 말단 부위에 존재하는 트랜스포존 유래의 뉴클레오티드 서열과 트랜스포존 삽입 과정 중 중복 복제된(duplicated) 목적 DNA 뉴클레오티드 서열을 제거하는 단계,
- 3) 2) 단계에서 뉴클레오티드 서열이 제거된 부위에 치환시키고자하는 코돈 뉴클레오티드를 삽입하고, 목적 DNA의 다른 쪽 말단에 트랜스포존 유래의 뉴클레오티드 서열과 목적 DNA의 연속한 3 bp의 뉴클레오티드 서열을 제거하는 단계,
- 4) 3) 단계에서 제조된 목적 DNA의 두 말단을 자가연결(self-ligation)시켜 무작위 위치에서 돌연변이된 라이브러리를 제조하는 단계, 및
- 5) 4) 단계에서 제조된 라이브러리를 적당한 숙주세포에서 발현시킨 후 목적 단백질을 선별하거나 스크리닝하여 원하는 특성을 가진 변이 폴리펩티드 및 이를 암호화하는 변이 폴리뉴클레오티드를 얻는 단계.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서,

2) 단계가 절단된 부위에 제 1 카세트 DNA를 도입하는 단계; 및 제한효소에 의한 카세트 DNA의 절단 및 트랜스포존 삽입 과정 중 중복된 서열이 존재하는 쪽 돌출 말단의 평활 말단화에 의하여 목적 DNA의 양쪽 말단 중 한쪽 말단 부위에 존재하는 트랜스포존 유래의 뉴클레오티드 서열과 트랜스포존 삽입 과정 중 중복 복제된(duplicated) 목적 DNA 뉴클레오티드 서열을 제거하는 단계를 포함하는 방법.

【청구항 3】

제 1 항에 있어서,

3) 단계가 절단된 부위에 치환시키고자하는 코돈 뉴클레오티드를 포함하는 제 2 카세트 DNA를 도입하는 단계; 및 제한효소에 의한 도입된 제 2 카세트 DNA의 절단 및 돌출 말단의 평활 말단화에 의하여 한쪽 말단 부위에는 치환시키고자하는 코돈 뉴클레오티드가 삽입되도록 하고 다른 쪽 말단에는 트랜스포존 유래의 뉴클레오티드 서열과 목적 DNA의 연속한 3 bp의 뉴클레오티드 서열을 제거하는 단계를 포함하는 방법.

【청구항 4】

다음과 같은 단계를 포함하는, 폴리펩티드 및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 진화시키는 방법:

1) 목적 DNA의 무작위 위치에 트랜스포존(transposon)을 삽입시킨 후, 트랜스포존의 양쪽 말단부위에 있는 제한효소부위를 절단하여 트랜스포존을 제거함으로써 무작위 위치에서 한번 절단된 구조의 목적 이중가닥 DNA들을 얻는 단계,

- 2) 목적 DNA의 절단된 양쪽 말단 중 한쪽 말단 부위에 존재하는 트랜스포존 유래의 뉴클레오티드 서열과 트랜스포존 삽입 과정 중 중복 복제된(duplicated) 목적 DNA 뉴클레오티드 서열을 제거하는 단계,
- 3) 2) 단계에서 뉴클레오티드 서열이 제거된 부위에 삽입시키고자하는 코돈 뉴클레오티드를 삽입하고, 목적 DNA의 다른 쪽 말단에 트랜스포존 유래의 뉴클레오티드 서열을 제거하는 단계,
- 4) 3) 단계에서 제조된 목적 DNA의 두 말단을 자가연결(self-ligation)시켜 무작위 위치에서 돌연변이된 라이브러리를 제조하는 단계, 및
- 5) 4) 단계에서 제조된 라이브러리를 적당한 숙주세포에서 발현시킨 후 목적 단백질을 선별하거나 스크리닝하여 원하는 특성을 가진 변이 폴리펩티드 및 이를 암호화하는 변이 폴리뉴클레오티드를 얻는 단계.

【청구항 5】

제 4 항에 있어서,

- 2) 단계가 절단된 부위에 제 1 카세트 DNA를 도입하는 단계; 및 제한효소에 의한 카세트 DNA의 절단 및 트랜스포존 삽입 과정 중 중복된 서열이 존재하는 쪽 돌출 말단의 평활 말단화에 의하여 목적 DNA의 양쪽 말단 중 한쪽 말단 부위에 존재하는 트랜스포존 유래의 뉴클레오티드 서열과 트랜스포존 삽입 과정 중 중복 복제된(duplicated) 목적 DNA의 뉴클레오티드 서열을 제거하는 단계를 포함하는 방법.

【청구항 6】

제 4 항에 있어서,

3) 단계가 절단된 부위에 삽입시키고자하는 코돈 뉴클레오티드를 포함하는 제 2 카세트 DNA를 도입하는 단계; 및 제한효소에 의한 도입된 제 2 카세트 DNA의 절단 및 돌출 말단의 평활 말단화에 의하여 한쪽 말단 부위에는 삽입시키고자하는 코돈 뉴클레오티드가 삽입되도록 하고 다른 쪽 말단에는 트랜스포존 유래의 뉴클레오티드 서열을 제거하는 단계를 포함하는 방법.

【청구항 7】

다음과 같은 단계를 포함하는, 폴리펩티드 및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 진화시키는 방법:

- 1) 목적 DNA의 무작위 위치에 트랜스포존(transposon)을 삽입시킨 후, 트랜스포존의 양쪽 말단부위에 있는 제한효소부위를 절단하여 트랜스포존을 제거함으로써 무작위 위치에서 한번 절단된 구조의 목적 이중가닥 DNA들을 얻는 단계,
- 2) 목적 DNA의 절단된 양쪽 말단 중 한쪽 말단 부위에 존재하는 트랜스포존 유래의 뉴클레오티드 서열과 트랜스포존 삽입 과정 중 중복 복제된(duplicated) 목적 DNA 뉴클레오티드 서열 부위, 및 목적 DNA의 다른 쪽 말단에 존재하는 트랜스포존 유래의 뉴클레오티드 서열과 목적 DNA의 연속한 3 bp의 뉴클레오티드 서열을 제거하는 단계,
- 3) 2) 단계에서 제조된 목적 DNA의 두 말단을 자가연결(self-ligation)시켜 무작위 위치에서 돌연변이된 라이브러리를 제조하는 단계, 및
- 4) 3) 단계의 라이브러리를 적당한 숙주세포에서 발현시킨 후 목적 단백질을 선별하거나 스크리닝하여 원하는 특성을 가진 변이 폴리펩티드 및 이를 암호화하는 변이 폴리뉴클레오티드를 얻는 단계.

【청구항 8】

제 7 항에 있어서, 2) 단계가 절단된 부위에 제 1 카세트 DNA를 도입하는 단계; 및 제한 효소에 의한 카세트 DNA의 절단 및 돌출 말단의 평활 말단화에 의하여 양쪽 말단 중 한 쪽 말단 부위에 존재하는 트랜스포존 유래의 뉴클레오티드 서열과 트랜스포존 삽입 과정에서 중복 복제된(duplicated) 목적 DNA의 일부 뉴클레오티드, 및 목적 DNA의 다른 쪽 말단에 존재하는 트랜스포존 유래의 뉴클레오티드 서열과 목적 DNA의 연속한 3 bp의 뉴클레오티드 서열을 제거하는 단계를 포함하는 방법.

【청구항 9】

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서,
단계 1)의 트랜스포존은 Tn4430, Tn7, mini-Mu 및 이들에서 유도된 트랜스포존의 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 10】

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,
단계 4)의 목적 DNA 내 무작위 위치에 삽입될 코돈의 염기서열이 특정된 (specific) 염기서열인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 11】

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,
단계 4)의 목적 DNA 내 무작위 위치에 삽입될 코돈의 염기서열이 무작위 (random) 염기서열인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 12】

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서,
 상기 목적 DNA는 효소, 항체, 항원, 결합단백질, 호르몬, 성장인자 및 혈장단백질로 이루어진 그룹으로부터 선택된 어느 하나의 단백질을 암호화하는 유전자 또는 그 일부인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 13】

제 12 항에 있어서,
 상기 효소는 가수분해효소 (hydrolase), 분해효소 (lyase), 전달효소 (transferase), 산화환원효소 (oxidoreductase), 연결효소 (ligase) 및 이성화효소 (isomerase)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 14】

제 2 항, 제 3 항, 제 5 항, 제 6 항 및 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제한효소가 클래스 IIS 제한효소인 방법.

【청구항 15】

다음과 같은 단계를 포함하는, 폴리펩티드 및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 진화시키는 방법:

- 1) 제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항의 방법에 의해 선발된 적어도 두 종류 이상의 변이 폴리뉴클레오티드에서 확인된 각각의 변이 DNA 서열을 하나의 주형 목적 폴리뉴클레오티드에 도입하여 복수의 변이 부위를 갖는 변이 폴리뉴클레오티드를 제조하는 단계, 및

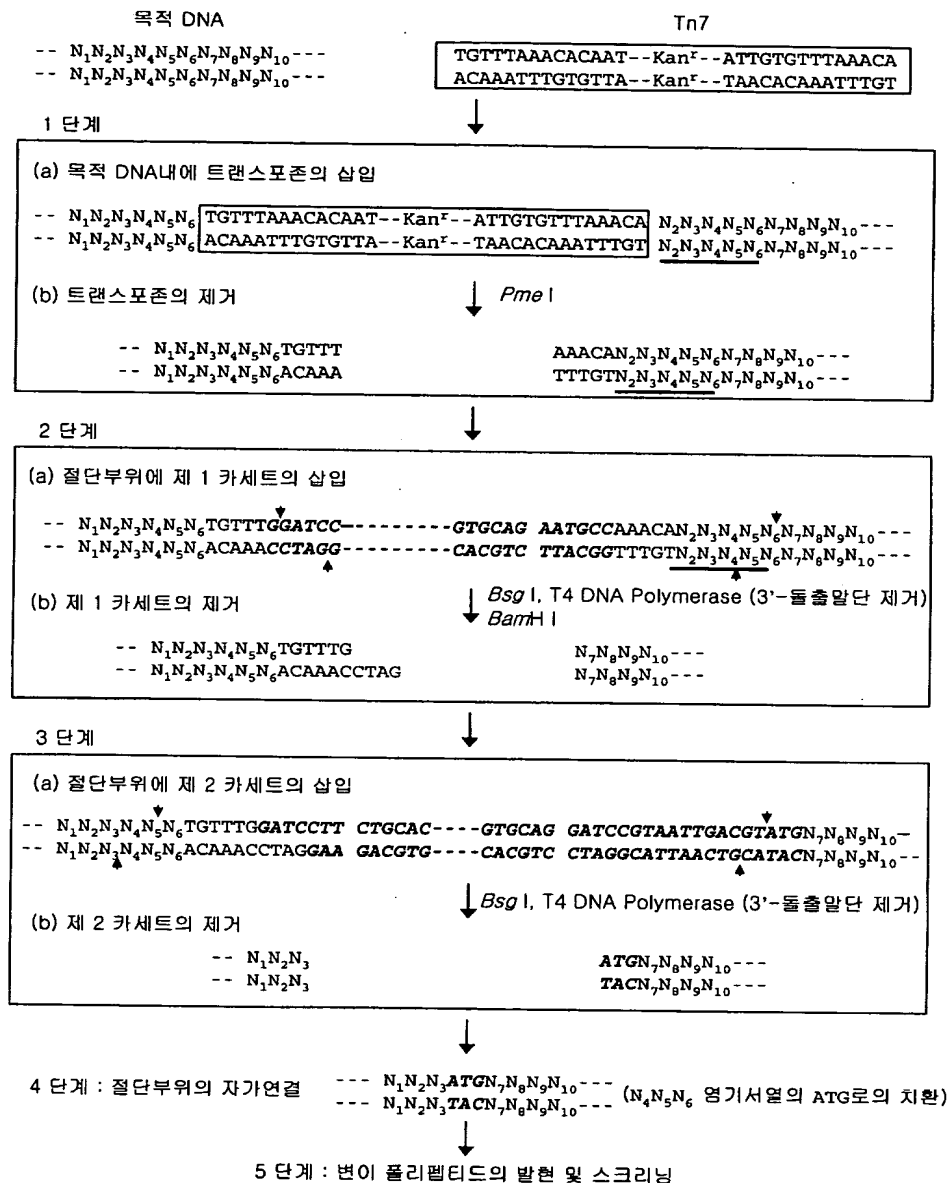
2) 단계 1)에서 제조된 변이 폴리뉴클레오티드로부터 발현되는 변이 폴리펩티드를 선별하거나 스크리닝하여 원하는 특성을 가진 변이 폴리펩티드 및 이를 암호화하는 변이 폴리뉴클레오티드를 얻는 단계.

【청구항 16】

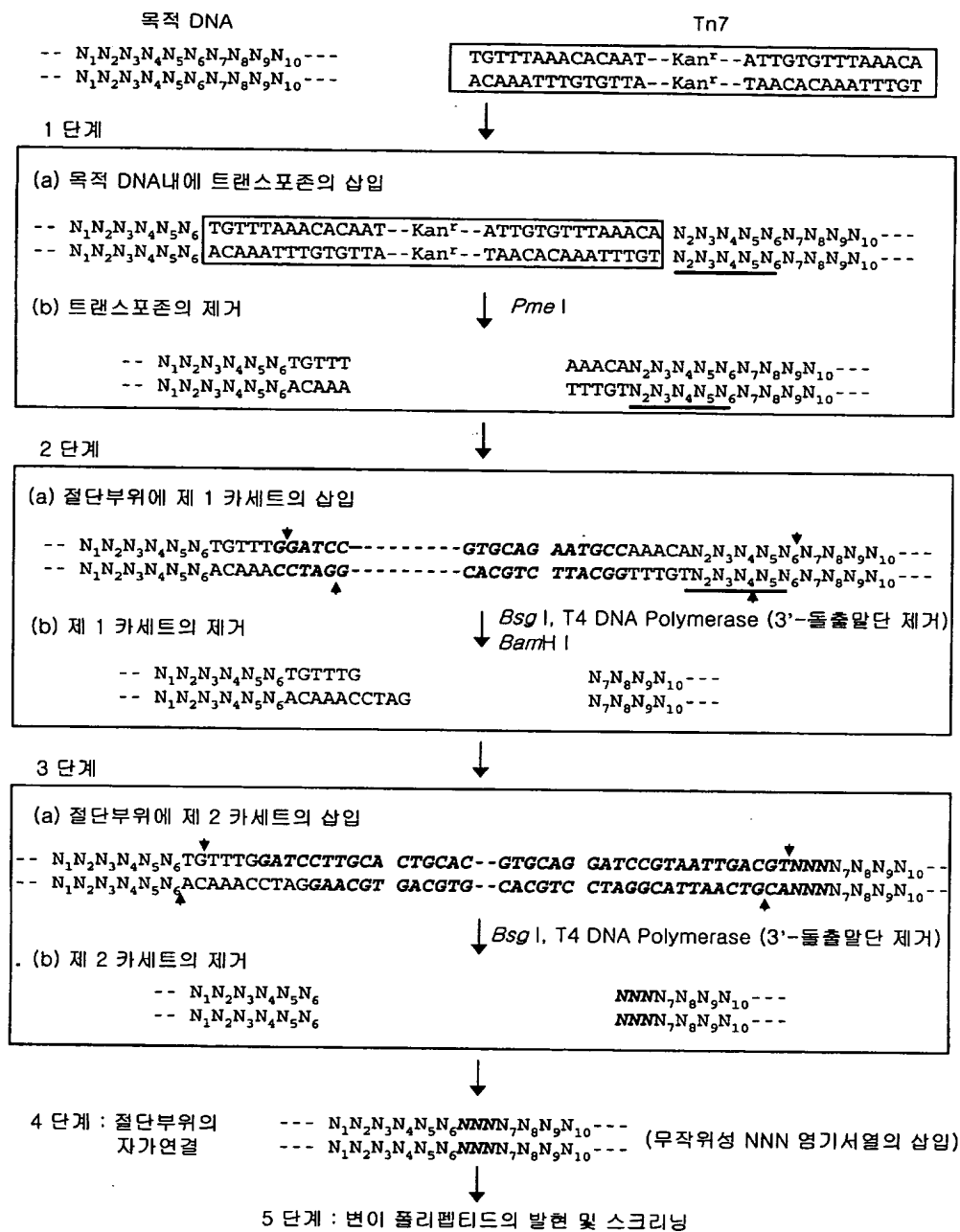
제 15 항의 방법에 따라 얻어진 변이 폴리뉴클레오티드를 목적 DNA로 하여 제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항의 방법을 반복하는 단계를 포함하는 폴리펩티드 및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 진화시키는 방법.

【도면】

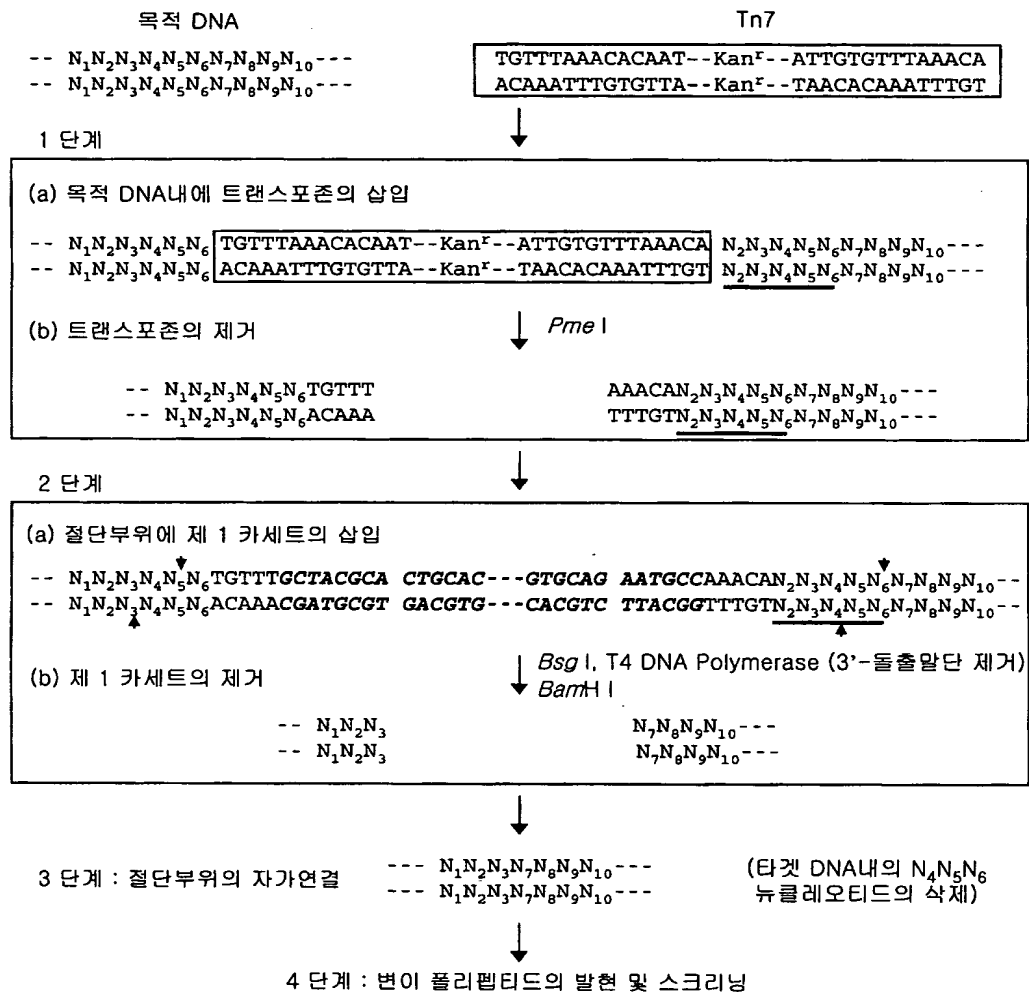
【도 1】



【도 2】



【도 3】



【도 4】

AlwI	GGATC (N) ₄ [^] CCTAG (N) ₅ [^]	BsmAI	GTCTC (N) ₁ [^] CAGAG (N) ₅ [^]	HphI	GGTGA (N) ₈ [^] CCACT (N) ₇ [^]
BbsI	GAAGAC (N) ₂ [^] CTTCTG (N) ₆ [^]	BsmB1	CGTCTC (N) ₁ [^] GCAGAG (N) ₅ [^]	MboII	GAAGA (N) ₈ [^] CTTCT (N) ₇ [^]
BbvI	GCAGC (N) ₈ [^] CGTCG (N) ₁₂ [^]	BsmF1	GGGAC (N) ₁₀ [^] CCCTG (N) ₁₄ [^]	MlyI	GAGTC (N) ₅ [^] CTCAG (N) ₅ [^]
BciVI	GTATCC (N) ₆ [^] CATAGG (N) ₅ [^]	BspM1	ACCTGC (N) ₄ [^] TGGACG (N) ₈ [^]	PleI	GAGTC (N) ₄ [^] CTCAG (N) ₅ [^]
BmrI	ACTGGG (N) ₅ [^] TGACCC (N) ₄ [^]	BsrDI	GCAATG (N) ₂ [^] CGTTAC (N) ₂ [^]	SapI	GCTCTTC (N) ₁ [^] CGAGAAG (N) ₄ [^]
BpmI	CTGGAG (N) ₁₆ [^] GACCTC (N) ₁₄ [^]	BtsI	GCACTG (N) ₂ [^] CGTCAC (N) ₂ [^]	SfaNI	GCATC (N) ₅ [^] CGTAG (N) ₉ [^]
BsaI	GGTCTC (N) ₁ [^] CCAGAG (N) ₅ [^]	EarI	CTCTTC (N) ₁ [^] GAGAAG (N) ₄ [^]	FokI	GGATG (N) ₉ [^] CCTAC (N) ₁₃ [^]
BseRI	GAGGAG (N) ₁₀ [^] CTCCTC (N) ₈ [^]	EciI	GGCGGA (N) ₁₁ [^] CCGCCT (N) ₉ [^]	HgaI	GACGC (N) ₅ [^] CTGCG (N) ₁₀ [^]
BsgI	GTGCAG (N) ₁₆ [^] CACGTC (N) ₁₄ [^]				

【서열목록】

<110> AMICOGEN, INC. <120> TRANSPOSON-MEDIATED RANDOM CODON-BASED MUTAGENESIS

<160> 9 <170> Kopatent In 1.71 <210> 1 <211> 27 <212> DNA <213>

Artificial Sequence <220> <223> CSN-N1 PRIMER <400> 1 aaaactgcag cattttatgt
agtaagc 27 <210> 2 <211> 23 <212>

DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> CSN-C1 PRIMER <400> 2 ccggaattcg
tatgctaatt ccc 23 <210> 3 <211>

33 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> BAM-FP PRIMER <400>
3 ggatcctatg tatccgctca tgagacaata acc 33 <210>

4 <211> 38 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> DEL-RP
 PRIMER <400> 4 ggcattctgc actcttcacc tagatccttt ttgatcag

38 <210> 5 <211> 43 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 BSG-SF PRIMER <400> 5 cgggatacctt ctgcactatg tatccgctca tgagacaata acc

43 <210> 6 <211> 49 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 BSG-SR PRIMER <400> 6 nnnacgtcaa ttacggatcc tgcactcttc acctagatcc tttttgatc

49 <210> 7 <211> 46 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 BSG-IF PRIMER <400> 7 cgggatacctt gcactgcact atgtatccgc tcatgagaca ataacc

46 <210> 8 <211> 41 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 BSG-DF PRIMER <400> 8 gctacgcact gcactatgta tccgctcatg agacaataac c

41 <210> 9 <211> 38 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 BSG-DR PRIMER <400> 9 ggcattctgc actcttcacc tagatccttt ttgatcag